



## Nagoya City University Academic Repository

学 位 の 種 類	博士（医学）
報 告 番 号	甲第1480号
学 位 記 番 号	第1066号
氏 名	福田 誠
授 与 年 月 日	平成 27 年 3 月 25 日
学位論文の題名	<p>Derivation of mesenchymal stromal cells from pluripotent stem cells through a neural crest lineage using small molecule compounds with defined media (化学合成培地を用いたヒト多能性幹細胞から神経堤細胞および間葉系間質細胞誘導法の確立)</p> <p>PLoS ONE 9(12): e112291. doi: 10.1371/journal.pone.0112291</p>
論文審査担当者	<p>主査： 澤本 和延 副査： 飛田 秀樹, 大塚 隆信</p>

## 【背景】

神経堤細胞は頭部骨格系、角膜、末梢神経系、皮膚色素細胞など多様な細胞種への分化能を有する、胎児期に現れる移動性の細胞集団である。多様な分化能を持つことから将来の細胞治療として有用であると考えられている。ヒト多能性幹細胞から神経堤細胞への分化誘導法はこれまでいくつか報告されているが、細胞移植治療として求められる安定性、誘導効率、簡便性については改善の余地があった。本研究では、これらの問題を改善し、細胞移植治療に最適な細胞の誘導法を確立することを目的とした。

## 【方法】

本研究ではヒト多能性幹細胞（iPS 細胞および ES 細胞）を用いて神経堤細胞を誘導することを試みた。これまで報告された誘導法の多くは誘導培地の中に牛血清を使用するなど将来の移植治療のためには改善が求められる点があった。我々は化学合成培地を組み合わせることでこの問題を改善した。また誘導効率を高めるために、GSK3  $\beta$  阻害剤および TGF  $\beta$  阻害剤と最小限の成長因子（インスリン）を基本培地に添加した。GSK3  $\beta$  阻害剤の濃度を検討し、神経堤細胞の誘導効率が最も高くなる濃度条件について検討した。また誘導された神経堤細胞を維持培養できる条件についても検討した。誘導された神経堤細胞が多分化能を有することの確認のために、末梢神経細胞、グリア細胞、色素細胞、角膜内皮細胞、間葉系間質細胞への分化誘導を試みた。従来、ヒト多能性幹細胞はマウス由来フィーダー細胞を足場として維持培養されていたが、フィーダー細胞および他種動物血清を用いずにヒト iPS 細胞の樹立、培養が可能になった（以下、フィーダーフリーiPS 細胞）。我々はフィーダーフリーiPS 細胞から神経堤細胞および間葉系間質細胞への分化誘導法についても検討した。

## 【結果】

培地条件および添加因子を調節して、ヒト多能性幹細胞から神経堤細胞のマーカーの一つである p75 強陽性細胞を FACS 解析にて同定した。また免疫染色により p75 陽性細胞は他の神経堤細胞マーカーである TFAP2A も陽性であることを確認した。FACS sorting により p75 強陽性細胞を抽出し、その他の神経堤マーカーについて RT-QPCR およびマイクロアレイによる網羅的遺伝子解析にて陽性であることを確認した。我々は、Wnt signal である GSK 3  $\beta$  阻害剤の濃度を調節することで、高効率（70-80%）に p75 強陽性細胞を誘導することに成功した。誘導した細胞は神経堤細胞のもつ分化能と同様に末梢神経細胞、グリア細胞、色素細胞、角膜内皮細胞への分化能を有していた。また、化学合成培地に EGF(Epidermal Growth Factor)と bFGF(basic Fibroblast Growth Factor)を添加することで、同細胞は少なくとも 10 回の継代培養が可能であった。間葉系間質細胞の一部は神経堤細胞由来であり、頭頸部の骨格、軟骨形成に関与しているとされている。我々は、次に神経堤細胞由来間葉系間質細胞の誘導を間葉系幹細胞培養（Mesenchymal Stem Cell 以下 MSC）培地でもある 10%牛血清含有培地に培地を変更することで行った。同条件で2週間培養を行うと、神経堤細胞は形態を変化させ MSC 様になり、この細胞は MSC のマーカーである CD73、CD105、CD44 が陽性となり CD45 が陰性となった。網羅的遺伝子解析では primary human bone marrow MSC と遺伝子情報が極めて類似していた。また、

誘導された間葉系間質細胞は骨・軟骨・脂肪への分化能を有していた。さらに我々は、マウス由来足場細胞や牛血清を用いないで樹立培養された **iPS** 細胞（以下 **Feeder Free iPS** 細胞）を化学合成培地で神経堤細胞を誘導した。誘導した神経堤細胞は、化学合成された **MSC** 誘導培地、骨誘導培地を用いることで、異種動物由来因子を含まない条件で骨誘導に成功した。

#### 【考察】

本研究では、将来の細胞移植治療を想定して、マウスや牛など異種動物由来の因子を除去しながら、効率的かつ簡便に神経堤細胞を誘導することを目指して行われた。誘導された神経堤細胞は状態を維持したままで継代培養および凍結保存が可能であり、移植治療に用いられる最終分化細胞を誘導するための中間体の細胞として有用であると考えられる。また、本研究は、**Feeder Free iPS** 細胞を用いることで、神経堤細胞、間葉系間質細胞を経て、最終分化細胞である骨まで化学合成培地のみで誘導することに成功しており。整形外科領域における骨移植および間葉系間質細胞移植において有用な素材になりうると考えられる。

（1716 文字）

## 論文審査の結果の要旨

本研究では、ヒト多能性幹細胞（iPS 細胞および ES 細胞：以下 PSC）から将来の細胞治療のために有用であるとされる神経堤細胞（Neural crest cells：以下 NCC）および間葉系間質細胞（Mesenchymal stromal cell：以下 MSC）の誘導を試みた。化学合成培地を基本培地として、GSK3 $\beta$  阻害剤および TGF $\beta$  阻害剤と最小限の成長因子（インスリン）を添加した培地で培養を行うと、PSC は細胞の形態を変化させた。この細胞に対して FACS 解析を行うと、これらの細胞の多くは p75 強陽性であり、同細胞は NCC 関連遺伝子を多く発現していた。Wnt signal 活性化作用を有する GSK 3  $\beta$  阻害剤の濃度を調節することで、高効率（70-80%）に NCC を誘導することに成功した。また誘導した NCC は、化学合成培地に EGF (Epidermal Growth Factor) と bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) を添加することで、少なくとも 10 回の継代培養が可能であった。誘導した NCC は、末梢神経細胞・グリア細胞・色素細胞・角膜内皮細胞への分化能を有していた。次に、NCC から MSC の誘導を試みた。NCC をヒト primary MSC 培養培地で 2 週間培養を行うと、細胞形態は変化し、MSC 関連マーカーの発現を認めた。誘導された MSC は骨・軟骨・脂肪への分化能を有していた。将来の細胞移植治療のためには、樹立・誘導・培養において動物由来因子を極力排除することが求められる。そこで、動物由来因子を使用せずに樹立・培養された iPS 細胞（feeder free iPS 細胞）から化学合成培地で NCC を誘導し、その後、これらの NCC を化学合成 MSC 誘導培地を用いて MSC に誘導した。さらに専用の誘導培地を使用することにより、動物由来因子を極力用いない方法で、最終分化細胞である骨細胞を誘導することに成功した。

本研究は、将来の細胞移植治療を想定して、マウスや牛など異種動物由来の因子を除去し、効率的かつ簡便に NCC および MSC を誘導することを目指して行われた。誘導された NCC および MSC は継代培養および凍結保存が可能であり、移植治療に用いられる最終分化細胞を誘導するための中間体の細胞として有用であると考えられる。

審査委員会では、主査（澤本和延教授）より、「NCC の誘導の際に用いた p75 表面マーカーについて知るところ」、「誘導した細胞の Stemness の証明について」、「MSC を将来の移植治療として用いる際に、ヒトのプライマリー MSC でなく iPS 細胞から誘導した MSC を用いる利点について」、「この iPS 細胞から NCC、MSC を誘導する方法は細胞治療以外にどのようなことに有用であるか」など 8 項目、第一副査（飛田秀樹教授）より、「本研究の一番の Novelty について」、「誘導の際に出現した p75 陰性の細胞集団について」、「誘導の際に細胞の扱いで気をつけた点」、「誘導した NCC および MSC の段階において iPS 細胞の混在の有無について」など 10 項目の質問を行った。また第二副査（大塚隆信教授）より「整形外科領域の再生医療について」、「血小板由来因子を用いた治療について」など 3 項目について質問を行った。いずれの質問に対しても十分な回答が得られ、本論文について十分に理解するとともに、専攻分野に関する知識を習得しているものと判断された。よって本論文の著者には博士（医学）の学位を授与するに値すると判断した。

論文審査担当者 主査 澤本 和延 副査 飛田 秀樹 大塚 隆信